

团

体

标

准

T/SHQAP 018—2024

人真皮成纤维细胞

Human dermal fibroblast

2024 - 12 - 27 发布

2025 - 01 - 27 实施

上海市医药质量协会 发布

目 次

前 言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	1
5 原材料和辅料	2
6 制备的一般要求	2
7 技术要求	2
8 检验方法	3
9 检验规则	3
10 标签	4
11 包装、储存及运输	4
12 废弃物处理	4
附 录 A （资料性） 细胞存活率检测 细胞计数法	5
附 录 B （规范性） 细胞标志蛋白检测 流式细胞法	6
附 录 C （规范性） 细胞功能指标检测 ELISA 法	8
附 录 D （规范性） 人成纤维细胞成瘤性检测 裸鼠皮下接种法	9

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由上海市医药质量协会提出。

本文件由上海市医药质量协会归口。

本文件起草单位：上海交通大学医学院附属第九人民医院、椎元医学技术（上海）有限公司、上海赛立维生物科技有限公司、上海慧存医疗科技有限公司、和元和美（上海）生物技术有限公司。

本文件主要起草人：赵杰、秦安、陈辰、施磊、范明、鄢和新、周仲奥、张琴、周丽、刘洋、温孟楠、杨昊、张桂诚、殷永红、翁智辉、潘讴东、潘珺屹、殷珊。

本文件首期承诺执行单位：上海交通大学医学院附属第九人民医院、椎元医学技术（上海）有限公司、上海赛立维生物科技有限公司、上海慧存医疗科技有限公司、上海赛尔维医疗科技有限公司、和元生物技术（上海）股份有限公司、和元和美（上海）生物技术有限公司、上海谱洛瑞生物医药有限公司、上海弗闰德生物科技有限公司。

人真皮成纤维细胞

1 范围

本文件规定了人真皮成纤维细胞的原材料和辅料、制备的一般要求、技术要求、检验方法、检验规则、标签、包装、储存及运输和废弃物处理要求。

本文件适用于人真皮成纤维细胞的制备和检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

中华人民共和国药典（2020年版）
GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
GB/T 2985 显微镜
GB 19815 离心机安全要求
GB/T 26497 电子天平
YY/T 0588 流式细胞仪
JJF 1665 细胞技术仪校准规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

人真皮成纤维细胞

人体皮肤组织的真皮层分离的细胞

注：人真皮成纤维细胞是疏松结缔组织的主要细胞成分，可通过产生和重塑细胞外基质（ECM）参与组织修复与再生、创伤愈合。

3.2

主细胞库

由细胞种子经培养至特定倍增水平或传代水平，并经一次制备获得并分装的同质和均一的悬液。

注：细胞种子是指已通过鉴定证明适用于生物制品生产或检测的，来源于人或动物的，由一个原始细胞群体发展成传代稳定的细胞群体，或经过克隆培养以及基因工程构建的均一细胞群体。

3.3

工作细胞库

由主细胞库的细胞经培养至特定倍增水平或传代水平，并经一次制备获得并分装的同质和均一的悬液。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AO/PI：吖啶橙（Acridine Orange）和碘化丙啶（Propidium Iodide）
CD：分化簇（Cluster of Differentiation）
COL1A1：I型胶原蛋白A1（Collagen Type IA1）
EBV：疱疹病毒（Epstein-Barr Virus）
ELISA：酶联免疫吸附试验（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay）
HBV：乙型肝炎病毒（Hepatitis B Virus）
HCMV：人类巨细胞病毒（Human Cytomegalovirus）

HIV: 人类免疫缺陷病毒 (Human Immunodeficiency Virus)
 HLA-DR, DP, DQ: 人白细胞抗原DR, DP, DQ (Human Leukocyte Antigen-DR, DP, DQ)
 HTLV: 人类T淋巴细胞病毒 (Human T-lymphotropic virus)
 PBMCs: 外周血单个核细胞 (Peripheral Blood Mononuclear Cells)
 TGFβ1: 转化生长因子β1 (Transforming Growth Factor Beta 1)
 TP: 梅毒螺旋体 (Treponema pallidum)
 HCV: 丙型肝炎病毒 (Hepatitis C Virus)
 Vimentin: 中间丝蛋白III型 (Intermediate Filament Protein Type III)

5 原材料和辅料

- 5.1 起始原材料的获取应符合伦理和法律法规,起始原材料供者应签署书面的合法有效的知情同意书,并建立起始原材料数据库,保护供者隐私信息。
- 5.2 应建立和执行供者评估及筛选方法,供者应至少筛查 HIV、HBV、HCV、HTLV、EBV、HCMV、TP,检测结果应均为阴性,应排除有遗传性疾病的供者,并应对供者进行一般情况筛查。
- 5.3 应建立和执行细胞采集、运输、交接与储存方法。
- 5.4 细胞培养过程中使用的培养基及其他添加物等应建立质量标准,并按照质量标准进行控制。
- 5.5 不宜使用动物血清或其他动物源成分,如必须使用,应确认无特定动物源性病毒感染。
- 5.6 细胞冻存时使用的辅料,应建立质量标准,并按照质量标准进行控制。

6 制备的一般要求

- 6.1 人真皮成纤维细胞培养所需的基础设施和环境条件,应符合生物安全的要求,满足产品质量控制需要的洁净条件并避免微生物污染和交叉污染。
- 6.2 制备方应对制备操作人员进行培训,建立考核标准,人员培训考核合格后进行制备操作。
- 6.3 制备方宜建立人真皮成纤维细胞的主细胞库和工作细胞库。
- 6.4 人真皮成纤维细胞应长期冻存于低于-130℃的环境下,并有相应的冻存记录,至少包含细胞名称,培养代次,冻存密度,冻存体积,冻存时间等信息。
- 6.5 人真皮成纤维细胞的制备应有标准操作规程,制备过程应符合标准操作规程的要求。
- 6.6 人真皮成纤维细胞培养或使用,应记录细胞名称,培养代次,细胞密度与细胞活率等信息。
- 6.7 人真皮成纤维细胞培养或使用,细胞代次不应超过 20 代。

7 技术要求

人成纤维细胞应符合表1中技术要求。

表 1 人成纤维细胞技术要求

类别	项目	技术要求
鉴别	细胞形态	细胞应呈梭形和/或星形,贴壁生长
	细胞标志蛋白*	CD105、CD90、Vimentin、COL1A1阳性比例均应≥80% CD45、HLA-DR, DP, DQ阳性比例均应小于5%
活率	细胞存活率	未冻存时,人真皮成纤维细胞存活率宜≥80% 冻存复苏时,人真皮成纤维细胞存活率宜≥70%
细胞功能	细胞因子分泌水平 (COL1A1)	≥0 ng/mL
	细胞因子分泌水平 (TGFβ1)	≥0 ng/mL
安全性	无菌检查	无菌生长
	细菌内毒素	<3 EU/mL
	异常毒性检查	动物全部健存且无异常反应,体重有增加
	支原体	阴性
	成瘤性	免疫缺陷动物体内成瘤实验结果应为阴性
	染色体核型	染色体核型应为46, XY或者46, XX。染色单体和染色体断裂≤26, 结构异常≤10, 超二倍体≤5, 亚二倍体≤90, 多倍体≤17

类别	项目	技术要求
* 细胞标志蛋白：人真皮成纤维细胞是高度异质性的群体，不同组织和不同生理或病理状态下的人真皮成纤维细胞可表达不同的标志物。		

8 检验方法

8.1 细胞形态

体外培养，二维贴壁培养条件下，用显微镜进行细胞形态观察。

8.2 细胞标志蛋白

按照附录B 细胞标志蛋白检测进行试验。

8.3 细胞存活率

按照附录A 细胞存活率检测进行试验。

8.4 细胞因子分泌水平（COL1A1）

按照附录C 细胞功能指标检测进行试验。

8.5 细胞因子分泌水平（TGFβ1）

按照附录C 细胞功能指标检测进行试验。

8.6 无菌检查

按照中华人民共和国药典（2020年版）四部 通则 1101无菌检查法进行试验。

8.7 细菌内毒素

按照中华人民共和国药典（2020年版）四部 通则 1143细菌内毒素检查法进行试验。

8.8 异常毒性检查

按照中华人民共和国药典（2020年版）四部 通则 1141异常毒性检查法进行试验。

8.9 支原体

按照中华人民共和国药典（2020年版）四部 通则 3301支原体检查法进行试验。

8.10 成瘤性

按照附录D：人成纤维细胞成瘤性检测进行试验。

8.11 染色体核型

按照中华人民共和国药典（2020年版）三部 生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制 要求进行试验。

9 检验规则

9.1 抽样方法

9.1.1 在一个制备周期中，同一供体来源、同一制备线、同一代次、同一天收获、同一方法制备出来的产品为一批。

9.1.2 在同一批中，每个检测项目（鉴别、活率、细胞功能、安全性）随机抽取1个此批次最小包装单元进行检验。

9.2 检验

9.2.1 每批次产品应进行出厂检验，并附检验报告。

9.2.2 出厂检验项目应涵盖第7章的全部项目。

9.3 判定规则

使用符合第5章要求的原材料和辅料、制备过程符合第6章要求，且出厂检验项目全部符合第7章的技术要求时，判为合格品；有1项及以上不符合要求时，判为不合格品。

10 标签

人真皮成纤维细胞产品应在包装上的规定位置上标注，标注内容至少应包括名称、细胞代次、细胞数量、制备批号、储存条件、制备日期等内容。

11 包装、储存及运输

11.1 包装

应选择对人真皮成纤维细胞关键质量属性无影响的材料和容器。

11.2 储存

11.2.1 应选择不影响细胞质量性状的细胞冻存液、细胞保护液及其他液体。

11.2.2 应在低于-130℃的环境下长期储存。

11.3 运输

11.3.1 应根据细胞的使用要求，选择合适的承运机构。承运机构应具备相应的功能单元，如人员、设备监控及调度等。

11.3.2 冻存的细胞应在低于-130℃条件下运输，非冻存细胞应在2℃~8℃条件下运输。细胞运输时介质，如细胞冻存液、细胞保护液及其他液体，应能保证细胞活性

12 废弃物处理

12.1 人真皮成纤维细胞制备和检测过程中产生的废弃物，应有完善的废弃物暂存、运输记录，应选择有资质的承运废弃物机构。

12.2 人真皮成纤维细胞制备和检测过程中不合格的细胞、剩余废弃的细胞或组织，应灭菌后，进行合法并符合伦理的处理。

附 录 A
(规范性)
细胞存活率检测 细胞计数法

A.1 仪器和设备

A.1.1 荧光细胞分析仪

荧光细胞分析仪应按照JJF 1665 要求进行仪器校准。

A.1.2 细胞计数板

应使用细胞技术仪适配的细胞计数板。

A.2 试剂

A.2.1 除另有说明外，所有试剂均为分析纯，检测用水应为符合GB/T 6682要求的一级水。

A.2.2 磷酸盐缓冲液：称取9 g氯化钠、0.2 g氯化钾、0.24 g磷酸二氢钾或1.44 g磷酸氢二钠、1.8 g磷酸氢二钾，全部溶解在800 mL的一级水中，使用盐酸调节溶液的pH值至7.4，加一级水至总体积为1升。该缓冲液的pH值应为7.2~7.4。

A.2.3 AO/PI染液：吖啶橙和碘化丙锭染料。

A.3 检测步骤

A.3.1 细胞悬液制备

收集待检测细胞，用磷酸盐缓冲液（A.2.2）配置细胞悬液，细胞悬液终浓度宜在 1×10^6 个细胞/mL到 1×10^7 个细胞/mL之间。

A.3.2 细胞染色

按1:1的体积比将AO/PI染液（A.2.2）与细胞悬液（A.3.1）混合均匀。

A.3.3 细胞计数

使用荧光细胞分析仪时，取混合好染料的样品（A.3.2），上样至计数板进行检测，每个样品需2个复孔检测。在仪器面板上输入实验名称，样品编号，选择细胞直径参数（12-24 μm ），输入稀释比例，读取总细胞密度、活细胞密度和活率。

A.3.4 计算与分析

细胞活率“%”、活细胞浓度“个细胞/mL”以及总细胞浓度“个细胞/mL”为仪器直接读取。

A.3.5 精密度

在重复性条件下进行两次独立测定，两次测定结果的绝对误差应不超过其算术平均值的10%。

附 录 B
(规范性)
细胞标志蛋白检测 流式细胞法

B.1 仪器和设备

B.1.1 流式细胞仪

应符合YY/T 0588要求。

B.1.2 水平离心机

应符合GB 19815要求。

B.1.3 电子天平

显示分度值0.1mg, 符合GB/T 264977要求。

B.2 试剂

B.2.1 除另有说明外, 所有试剂均为分析纯, 检测用水均为符合GB/T 6682要求的一级水。

B.2.2 磷酸盐缓冲液, 按照A.2.2要求配制。

B.2.3 抗人 CD90, CD105, COL1A1, Vimentin, CD45, HLA-DR, DP, DQ抗体及同型对照抗体。

B.2.4 穿膜液: 可用氯化钠注射液配制, 体积比为0.5%曲拉通X-100缓冲液, 或直接购买市售穿膜液。穿膜液应于2℃~8℃保存。

B.2.5 封闭液: 可用氯化钠注射液配制体积比为10%羊血清缓冲液, 或直接购买市售封闭液。封闭液应于2℃~8℃保存。

B.2.6 固定液: 含有4%多聚甲醛的组织固定液, 于2℃~8℃保存。

B.2.7 洗涤液: 磷酸盐缓冲液, 于2℃~8℃保存。

B.3 样品保存

标记后的样品应于2℃~8℃保存。

B.4 检测步骤

B.4.1 样品准备

收集细胞, 用水平离心机 (B.1.2) 300×g, 离心4 min, 弃去上清液, 用洗涤液清洗一遍样品, 再用水平离心机 (B.1.2) 300×g, 离心4 min, 弃去上清液。

B.4.2 抗体孵育

B.4.2.1 细胞表面标志物抗体孵育

选择细胞标志蛋白对应的抗体及同型对照抗体, 按照供应商提供的抗体说明书稀释抗体, 抗体与细胞悬液混匀后, 于2℃~8℃孵育30 min~60 min。

孵育结束后, 用洗涤液清洗样品两遍, 用水平离心机 (B.1.2) 300×g, 离心4 min, 弃去上清液。

B.4.2.2 细胞胞内标志物抗体孵育

样品放入15mL离心管中, 加入1mL固定液, 固定30min后, 用水平离心机 (B.1.2) 300×g, 离心4min, 弃去上清液。

样品离心管中加入1mL穿膜液, 孵育30min后, 用水平离心机 (B.1.2) 300×g, 离心4min, 弃去上清液。

样品离心管中加入1mL封闭液，孵育30 min后，用水平离心机（B.1.2） $300\times g$ ，离心4min，弃去上清液。

选择细胞标志蛋白对应的抗体及同型对照抗体，按照说明书稀释抗体，抗体与细胞悬液混匀后，于 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min~60 min。

孵育结束后，用洗涤液清洗两遍，用水平离心机（B.1.2） $300\times g$ ，离心4min，弃去上清液。

B.4.3 过滤上机

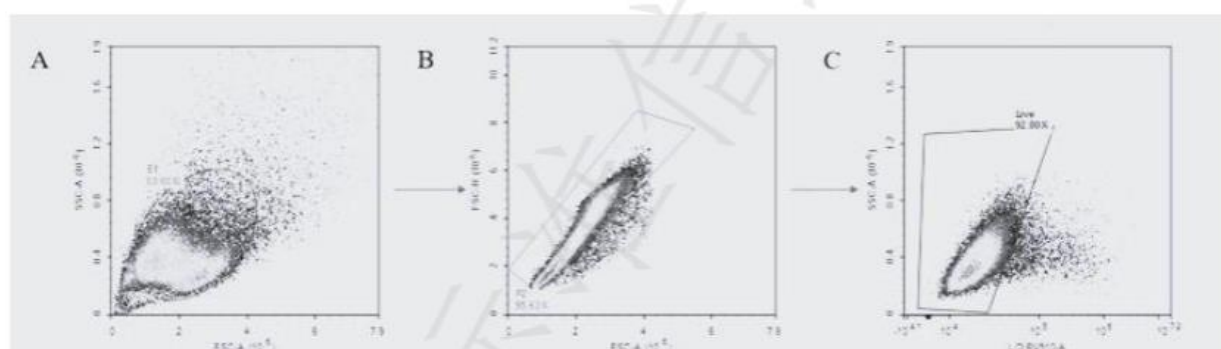
用洗涤液重悬细胞，通过孔径为 $40\mu\text{m}$ 滤网转移到流式管中，使用流式细胞仪（B.1.1）上机检测。

B.4.4 圈门设定

B.4.4.1 根据细胞大小和颗粒度设门圈出目标细胞分群1，排除死细胞和其他杂细胞，如图B.1。

B.4.4.2 根据同型对照抗体组荧光强度，在分群1的基础上画出阳性细胞群2，排除没有被荧光抗体标记的阴性细胞，如图B.1中C。

图 B.1 圈门示意图



B.4.4.3 同型对照抗体作为阴性对照。

B.4.4.4 根据B.4.4.2画群的结果，显示细胞标志蛋白的阳性比率。

附 录 C
(规范性)
细胞功能指标检测 ELISA 法

C.1 仪器和设备

多功能酶标仪，应可以进行试剂盒推荐的波长检测

C.2 试剂

COLIA1检测试剂盒和TGFβ1检测试剂盒。

C.3 样品保存

C.3.1 实验组为培养成纤维细胞3天的培养上清液，保存于2℃~8℃。

C.3.2 对照组为成纤维细胞培养用培养基，保存于2℃~8℃。

C.4 检测步骤

C.4.1 样品准备

收集5 mL培养成纤维细胞3天的培养上清液，放入离心管中，用水平离心机（B.1.2）300×g，离心4 min，取上清液，保存于2℃~8℃。

C.4.2 样品检测

C.4.2.1 按试剂盒操作说明将标准品稀释至推荐的标准曲线使用浓度，样品稀释至推荐比例。

C.4.2.2 将稀释后的标准品和样品加入试剂盒中的检测板内并孵育一抗。

C.4.2.3 一抗孵育完成后清洗检测板，去除残留洗涤液。

C.4.2.4 孵育带标签的二抗。

C.4.2.5 孵育完成后清洗检测板，去除残留洗涤液。

C.4.2.6 检测板内加入显色剂，充分反应。

C.4.2.7 根据试剂盒操作说明中推荐检测波长，使用多功能酶标仪（C.1）进行检测。

C.4.3 计算

根据标准曲线获得的样品浓度与酶标仪读数换算公式，将样品的酶标仪读数带入公式计算，得到对应的样品浓度。

C.5 判断标准

C.5.1 细胞因子分泌水平（COLIA1）：当COLIA1检测试剂盒检测结果大于等于0 ng/mL 时，判断为分泌COLIA1。

C.5.2 细胞因子分泌水平（TGFβ1）：当TGFβ1检测试剂盒检测结果大于等于0 ng/mL 时，判断为分泌TGFβ1。（与正文中参数对应）

附录 D

(规范性)

人成纤维细胞成瘤性检测 裸鼠皮下接种法

D.1 仪器和设备

D.1.1 荧光细胞分析仪

荧光细胞分析仪应按照JJF 1665 要求进行仪器校准。

D.1.2 细胞计数板

应使用细胞技术仪适配的细胞计数板。

D.1.3 水平离心机

应符合GB 19815标准要求。

D.2 试剂

D.2.1 除另有说明外，所有试剂均为分析纯，检测用水均为符合GB/T 6682要求的一级水。

D.2.2 磷酸盐缓冲液：按照A.2.2配制，并进行高压蒸汽灭菌。

D.2.3 消化酶。

D.2.4 AO/PI染液：吖啶橙和碘化丙锭染料。

D.3 检测步骤

D.3.1 细胞消化

人真皮成纤维细胞贴壁培养，汇合度达到80%以上时，用消化酶消化，用水平离心机（D.1.3）300×g，离心4 min，弃去上清液，用磷酸盐缓冲液（D.2.2）重悬细胞。

D.3.2 细胞计数

按A.3.3进行，使用细胞计数板（D.1.2）及荧光细胞分析仪（D.1.1）计算细胞悬液活细胞浓度，根据计数浓度，调整细胞密度至 5×10^7 个细胞/mL。

D.3.3 细胞移植

实验组：将 1×10^7 个人真皮成纤维细胞活细胞，注射到6至8周龄的免疫缺陷型小鼠皮下，空白对照组不做处理，阳性对照组：人肿瘤细胞系，按照肿瘤细胞系接种要求的数量注射，为荷瘤小鼠。

D.3.4 肿瘤观察

接种后观察16周，每周测量小鼠体重、肿瘤大小，若荷瘤小鼠肿瘤超过 2000mm^3 ，或者肿瘤溃烂或体重下降，可考虑执行人道终点，16周后剥离小鼠身上肿瘤，行大体观察，瘤体称重，计算成瘤率。

D.4 结果分析

成瘤率按公式（D.1）计算：

$$B = N1 \times 100 / N2 \quad \text{..... (D.1)}$$

式中：

B——成瘤率，%；

N1——荷瘤小鼠总数，只；

N2——接种小鼠总数，只。

D.5 判断标准

根据D.4，空白对照组小鼠成瘤率等于0%，并且阳性对照组成瘤率大于等于90%时，实验组成瘤率小于20%，可判定为免疫缺陷动物体内成瘤实验结果阴性
